

• 研究论文 •

# 掘氏疫霉抗土菌灵突变体的诱导及其特性研究

朱志峰<sup>1</sup>, 潘洪玉<sup>2</sup>, 张浩<sup>1</sup>, 姜辉<sup>3</sup>, 袁善奎<sup>3\*</sup>, 严清平<sup>3</sup>

(1 吉林农业大学 资源与环境学院, 吉林 长春 130118 2 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062

3 农业部农药检定所 生物技术研究测试中心, 北京 100026)

**摘要:**掘氏疫霉 *Phytophthora drechsleri* 是引起黄瓜疫病的主要病原菌。采用紫外线诱导获得了 20 株掘氏疫霉抗土菌灵的突变体, 并对其生物学特性进行了研究。结果表明, 掘氏疫霉对土菌灵的抗性突变频率高于对甲霜灵的抗性突变频率, 但其抗性水平低于抗甲霜灵突变体, 在 1.3~4.3 倍之间; 掘氏疫霉对土菌灵的抗性在继代培养和常温保存过程中稳定, 突变体的生长速率与亲本敏感菌株相比发生了不同程度的变化; 此外, 掘氏疫霉抗土菌灵突变体对甲霜灵和烯酰吗啉无交互抗性。

**关键词:**掘氏疫霉; 土菌灵; 抗性突变体; 特性

中图分类号: S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)04-0323-04

## Induction and Characteristics of Mutants of *Phytophthora drechsleri* Resistant to Etridiazole

ZHU Zhi-feng<sup>1</sup>, PAN Hong-yu<sup>2</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, JIANG Hui<sup>3</sup>  
YUAN Shan-kui<sup>3\*</sup>, YAN Qing-ping<sup>3</sup>

(1. College of Resource and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China;

3. Center for Agrochemical Biological and Environmental Technology, Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China)

**Abstract** Twenty etridiazole-resistant mutants of *Phytophthora drechsleri* were obtained by ultraviolet irradiation, and some of their biological characteristics were studied in vitro. The results showed that frequency of mutation in *P. drechsleri* that resistant to etridiazole was higher than that resistant to metalaxyl, while etridiazole-resistant level was much lower than that of metalaxyl+resistance, the resistance factor(RF) for etridiazole was ranged from 1.32 to 4.31. The resistance to etridiazole was stable in the process of continuous transfer cultivation and long conservation under room temperature. As compared to their parental sensitive isolate, the growth rates of mutants changed more or less. In addition, there was no cross-resistance between etridiazole and metalaxyl or dimethomorph.

**Key words** *Phytophthora drechsleri*; etridiazole; resistant mutants; characteristics

由掘氏疫霉 *Phytophthora drechsleri* Tucker 引起的黄瓜疫病, 在全国各黄瓜产区均有发生, 其中

以北方秋黄瓜、南方春黄瓜发病较重<sup>[1]</sup>。黄瓜疫病可造成黄瓜大面积死亡, 减产幅度一般在 20%

收稿日期: 2006-08-02; 修回日期: 2006-09-20.

作者简介: 朱志峰 (1980-), 男, 硕士研究生; \* 通讯作者: 袁善奎 (1976-), 男, 博士, 高级农艺师, 主要从事杀菌剂毒理及其抗性研究. 联系电话: 010-85390886, E-mail: skyuan7611@yahoo.com.cn

左右,是影响黄瓜生产的重要因素之一。该病原菌除为害黄瓜外,还可侵染丝瓜、冬瓜、西瓜、南瓜、葫芦、菜瓜、瓠瓜、甜瓜、白兰瓜、哈密瓜、苦瓜、越瓜等葫芦科作物及葫芦科之外的雪松、非洲菊、刺槐、银合欢、印度枣等 23 科 86 种植物。目前对黄瓜疫病的防治主要依赖化学药剂,如甲霜灵、霜霉威、百菌清、烯酰吗啉、三乙基磷酸铝、土菌灵、代森锰锌等。其中土菌灵是有利来路化学公司(Uniroyal Chemical Co.)开发的噻二唑类杀菌剂,通过抑制病菌的脂质过氧化而起作用,是一种优良种子和土壤处理剂,可防治镰孢属、疫霉属、腐霉属和丝核菌属真菌引起的猝倒、根腐、茎腐等多种作物病害<sup>[2]</sup>。目前国内外尚未见关于掘氏疫霉对土菌灵抗性的研究报道。作者以掘氏疫霉为靶标菌,以已知的高抗性风险药剂甲霜灵为对照药剂,通过在室内诱导掘氏疫霉对这两种药剂的抗药突变体并研究其部分生物学性质,旨在为评价掘氏疫霉对土菌灵的抗性风险提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试病菌和药剂

菌株代号为 PM-01 的掘氏疫霉 *Phytophthora*

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照菌落直径}(\text{mm}) - \text{处理菌落直径}(\text{mm})}{\text{对照菌落直径} - 5(\text{mm})} \times 100 \quad (1)$$

1.2.2 抗药突变体的诱导 将培养 5 d 的掘氏疫霉于 20 W 紫外灯垂直下方 16 cm 处照射 45 s,然后制取直径为 4 mm 的菌饼,转接于分别含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  土菌灵和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  甲霜灵的 PSA 培养基上,菌丝面朝下,于 25℃ 黑暗条件下培养。连续观察菌落生长情况,并将菌饼边缘出现的扇形角突变体转接至含有 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  相应药剂的 PSA 平板上,能生长者视为抗药突变体,并转接至 PSA 斜面上保存待试,同时由 (2) 式计算产生抗性角突变体的频率(%)。

$$\text{突变频率}(\%) = \frac{\text{抗性角突变体数}}{\text{测试菌饼总数}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.3 抗药突变体的抗性水平测定 参照 1.2.1 节的方法分别测定突变体及其亲本菌株对药剂的敏感性,然后求出各抗药突变体的抗性水平(RF, Resistance Factor),即  $\text{RF} = \text{EC}_{50}(\text{抗药突变体}) / \text{EC}_{50}(\text{亲本敏感菌株})$ 。

*drechsleri* Tucker 由中国农业大学种子病理药理学实验室提供,对土菌灵和甲霜灵均敏感。

92% 土菌灵(etridiazole)原药(浙江禾益农化有限公司生产);98% 甲霜灵(metalaxyl)原药(新加坡利农私人有限公司生产);95.5% 烯酰吗啉(dimethomorph)原药(江苏耕耘农化有限责任公司生产)。以丙酮为溶剂,分别将上述原药配制成  $1 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$  的母液,于 4℃ 冰箱中保存备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 掘氏疫霉对药剂的敏感性测定 采用菌丝生长速率法。沿在马铃薯蔗糖培养基(PSA)平板上培养 5 d 的掘氏疫霉菌落边缘制取直径 5 mm 的菌饼,分别接种到含系列浓度药剂及不含药的平板上。每处理重复 3 次,25℃ 黑暗条件下培养 4 d 后测量菌落直径,并按 (1) 式计算各药剂处理浓度对病菌菌丝生长的抑制率(%)。

将抑制率转换为机率值(Y),药剂浓度转换为对数值(x),求得药剂对突变体的毒力回归方程  $Y = A + Bx$  以及有效抑制中浓度( $\text{EC}_{50}$ )。

1.2.4 抗土菌灵突变体在离体条件下的生长速率 将各抗药突变体及其亲本菌株在 PSA 平板上 25℃ 下培养 5 d 然后在靠近菌落边缘处制取直径为 5 mm 的菌饼接种于 PSA 平板上,25℃ 下黑暗培养 4 d 后测量菌落直径,每菌株重复 3 次,采用 SPSS 统计软件比较各菌株之间生长速率的差异显著性。

1.2.5 抗土菌灵突变体的交互抗性测定 选择 5 株抗土菌灵突变体及其亲本敏感菌株,参照 1.2.1 节的方法,分别测定这些菌株对土菌灵、甲霜灵、烯酰吗啉等药剂的敏感性,然后分析抗土菌灵突变体对另外两种药剂的抗药性。

1.2.6 抗土菌灵突变体的抗药稳定性研究 选择 1 株抗土菌灵突变体,在无药 PSA 平板上连续转代培养 7 代后测定其对土菌灵的敏感性,并与转代前的敏感性进行比较,观察抗土菌灵突变体的抗药稳定性。此外,将所获得的抗药突变体及其亲本菌株在 25℃ 下保存 45 d 后转接于含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  土菌灵的 PSA 平板上,观察各抗药突变体的抗药

稳定性。

## 2 结果与分析

菌饼产生抗性角突变体的频率为 4.44%, 从供试的 300 个菌饼中共获得 2 株抗甲霜灵的突变体, 菌饼产生抗甲霜灵突变体的频率为 0.67%。

2.1 抗药突变体诱导结果

病原菌 PM-01 在分别含 10 μg/mL 土菌灵和 10 μg/mL 甲霜灵的 PSA 平板上的生长均受到完全抑制。经过紫外线诱变, 7 d 后少数菌落边缘开始出现快速生长的角状突变体, 到第 15 d, 将各抗药角突变体分别转接至含 10 μg/mL 土菌灵和 10 μg/mL 甲霜灵的 PSA 平板上进行验证, 从供试的 450 个菌饼中共获得 20 株抗土菌灵的突变体,

2.2 抗药突变体的抗性水平

所有抗土菌灵突变体经验证均能在 10 μg/mL 浓度土菌灵 PSA 平板上生长, 对抗药突变体及其亲本敏感菌株对土菌灵的敏感性测定结果 (表 1) 表明, 土菌灵对亲本菌株的 EC<sub>50</sub> 为 0.398 μg/mL, 20 株抗药突变体的 EC<sub>50</sub> 与亲本菌株相差较小, 在 0.523~1.70 μg/mL 之间, 抗性水平 (RF) 在 1.32~4.28 倍之间, 平均抗性倍数为 2.03。

Table 1 Comparison of the sensitivity of *P. drechsleri* to etridiazole and the growth rate between the parent strain PM-01 and its etridiazole-resistant mutants

Iso lates	Y = A + Bx	r	EC <sub>50</sub> /( μg/mL)	RF (Resistant factors)	Colony diameter - 5/(mm)
PM-01	Y = 5.9141 + 2.2674x	0.9886	0.398	/	56.0 de <sup>*</sup>
PM-01-01	Y = 5.0006 + 1.8062x	0.9940	0.999	2.51	55.5 de
PM-01-02	Y = 4.6451 + 1.5346x	0.9786	1.703	4.28	63.5 c
PM-01-03	Y = 5.4945 + 1.9766x	0.9362	0.562	1.41	53.0 def
PM-01-04	Y = 5.0706 + 1.6862x	0.9327	0.908	2.28	57.0 d
PM-01-05	Y = 5.5218 + 2.6574x	0.9641	0.636	1.60	44.0 hi
PM-01-06	Y = 5.8343 + 2.9695x	0.9677	0.524	1.32	53.0 def
PM-01-07	Y = 4.6587 + 1.6532x	0.9227	1.609	4.05	80.0 a
PM-01-08	Y = 5.7417 + 2.8588x	0.9907	0.550	1.38	52.0 defg
PM-01-09	Y = 5.1627 + 1.8548x	0.9620	0.817	2.06	71.0 b
PM-01-10	Y = 5.2254 + 2.1473x	0.9935	0.785	1.98	46.5 gh
PM-01-11	Y = 5.3610 + 1.5411x	0.9835	0.583	1.47	52.0 def
PM-01-12	Y = 5.1524 + 2.1260x	0.9221	0.848	2.13	65.0 c
PM-01-13	Y = 5.2277 + 1.5900x	0.9894	0.719	1.81	54.0 de
PM-01-14	Y = 5.3474 + 2.9429x	0.9932	0.762	1.92	56.0 de
PM-01-15	Y = 5.0816 + 1.5133x	0.9560	0.883	2.22	51.0 efg
PM-01-16	Y = 5.6062 + 2.1540x	0.9939	0.523	1.32	65.0 c
PM-01-17	Y = 5.1660 + 2.1532x	0.9783	0.837	2.11	44.0 hi
PM-01-18	Y = 5.4000 + 1.6093x	0.9784	0.564	1.42	40.0 i
PM-01-19	Y = 4.9957 + 1.3154x	0.9831	1.008	2.53	49.0 fgh
PM-01-20	Y = 5.5385 + 2.0415x	0.8830	0.545	1.37	55.0 defg

\* Significance level in the same column with Duncan's test at P = 0.05

甲霜灵对 PM-01 的 EC<sub>50</sub> 值为 0.118 μg/mL。虽然仅获得了 2 株抗甲霜灵突变体, 但它们的 EC<sub>50</sub> > 500 μg/mL, 表现出极高的抗性水平。说明掘氏疫霉对土菌灵的抗性突变频率高于对甲霜灵的抗性突变频率, 但抗性水平较低。

2.3 抗土菌灵突变体的生长速率

亲本敏感菌株 PM-01 及其抗土菌灵突变体的生长速率测定结果 (表 1) 表明, 各菌株在 25℃ 下

培养 4 d 后, 亲本菌株菌落直径为 61.0 mm, 抗药突变体菌落直径在 40.0~80.0 mm 之间。方差分析结果表明, 掘氏疫霉对土菌灵产生抗药性并不意味着其生长速率必然上升或下降, 实际上生长速率的变化与抗性水平无关。

2.4 突变体对几种杀菌剂的交互抗性测定

甲霜灵对 PM-01 的 EC<sub>50</sub> 值为 0.118 μg/mL, 对另外 5 株抗土菌灵突变体的 EC<sub>50</sub> 值在 0.070~

0.115  $\mu\text{g/mL}$ 之间; 烯酰吗啉对 PM-01 的  $\text{EC}_{50}$  值为 0.211  $\mu\text{g/mL}$ , 对另外 5 株抗土菌灵突变体的  $\text{EC}_{50}$  值在 0.124~0.294  $\mu\text{g/mL}$  之间, 表明野生敏感菌株和抗土菌灵的突变体均对甲霜灵和烯酰吗啉敏感。从图 1 可以看出, 随着突变体对土菌灵的敏感性下降, 其对甲霜灵和烯酰吗啉的敏感性并未出现有规律的变化, 说明抗土菌灵的突变体对甲霜灵和烯酰吗啉不存在交互抗性。

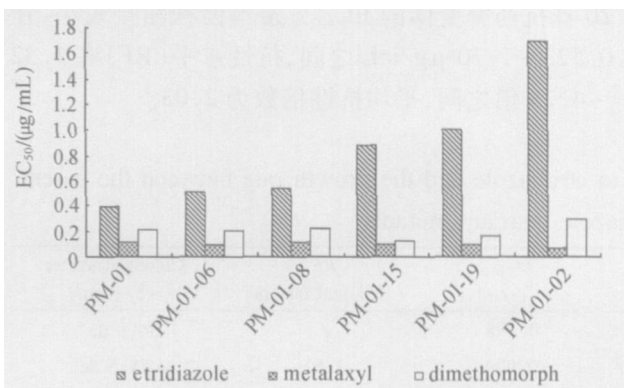


Fig 1 Comparison of the sensitivities of PM-1 and its etridiazole-resistant mutants to etridiazole, metalaxyl and dimethomorph

## 2.5 抗药稳定性

抗土菌灵突变体 PM-01-01 在无药 PSA 平板上连续转代培养 7 代后, 其  $\text{EC}_{50}$  值为  $1.028 \pm 0.131 \mu\text{g/mL}$ , 与其继代培养前的  $\text{EC}_{50}$  ( $1.113 \pm 0.135 \mu\text{g/mL}$ ) 相比, 置信区间重叠, 无显著差异, 说明供试的抗土菌灵突变体在继代培养过程中抗性没有丧失。此外, 所有抗土菌灵突变体在  $25^\circ\text{C}$  下保存 45 d 经活化后仍能在含  $10 \mu\text{g/mL}$  土菌灵的培养基上生长, 而敏感菌株在该浓度下生长完全受到抑制, 说明在保存过程中抗性也是稳定的。上述结果表明尽管抗土菌灵突变体的抗性水平较低, 但其抗性比较稳定, 说明掘氏疫霉对土菌灵的抗性是由遗传基因的突变引起的, 而并非是对药剂的一种暂时的适应现象。

## 3 讨论

在植物病害防治过程中, 由于长期依赖化学药剂以及不科学用药, 使得大量病原菌产生了抗性, 如甲霜灵已在大多数卵菌中出现了严重的抗性问题<sup>[3-6]</sup>, 阻碍了该药剂在生产中的继续使用, 被 FRAC 划分为高抗性风险杀菌剂<sup>[2]</sup>。

尽管菌饼产生抗性角突变体的频率不能客观

地反映出抗性基因突变的频率, 但由于采用了相同的紫外线照射剂量, 因此根据菌饼产生抗药角突变体的频率能反映出抗甲霜灵和土菌灵的相对突变频率高低。本研究表明, 与高抗性风险药剂甲霜灵相比掘氏疫霉对土菌灵产生抗性突变的频率高于对甲霜灵的抗性突变频率, 但对土菌灵的抗性水平较低, 都在 5 倍以下, 且抗性水平表现连续性分布, 因此在较短的时间内不易因抗性产生而导致土菌灵田间防治失效; 而甲霜灵的抗性水平较高, 一旦产生抗性, 在药剂的选择压力下抗性群体会迅速上升, 短时间内就会出现田间防效下降的问题。因此, 掘氏疫霉对土菌灵的室内抗性风险低于对甲霜灵的抗性风险, 但由于抗土菌灵突变体的抗性稳定, 且部分抗药突变体的菌丝生长速率相对亲本菌株未出现明显下降, 因此仍然存在潜在的抗性风险, 更不能忽视实际使用中的抗性风险问题。此外, 由于抗土菌灵的掘氏疫霉对甲霜灵和烯酰吗啉不存在交互抗药性, 因此这几种药剂可以在生产中交替和轮换使用, 以延缓或避免掘氏疫霉对土菌灵出现抗性问题。

由于掘氏疫霉为二倍体卵菌, 虽然获得的抗土菌灵突变体的抗性水平较低, 但其是否会在有性重组过程中发生抗性基因的交换重组, 从而出现高抗性水平的菌株尚值得进一步探索研究。

## 参考文献:

- [1] CAO Ruo-bin (曹若彬), LIN Yu-song (林玉松), HU You-mei (胡幼梅). 黄瓜疫病的研究 [J]. J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci) [浙江大学学报(农业与生命科学版)]. 1981 (3): 63-71.
- [2] LIU Chang-ling (刘长令). The World Pesticide Book (Fungicide) [世界农药大全(杀菌剂卷)] [M]. Beijing (北京): Chemistry Industry Press (化学工业出版社), 2006. 218-219, 403.
- [3] Davile L C. Resistance to acylalanine fungicides in *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* [J]. Netherland J Plant Pathology, 1981, 87(1): 11-24.
- [4] Bruin G C A, Edgington L V. Induction of fungal resistance to metalaxyl by ultraviolet irradiation [J]. Phytopathology, 1982, 72(5): 476-480.
- [5] Joseph M C, Coffey M D. Development of laboratory resistance to metalaxyl in *Phytophthora citricola* [J]. Phytopathology, 1984, 74(8): 1411-1414.
- [6] Bowler L A, Coffey M D. Development of laboratory tolerance to phosphorus acid fosetyl A and metalaxyl in *Phytophthora capsici* [J]. Canadian J Plant Pathology, 1985, 7(1): 1-6.

(Ed. JN SH)